



10 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift

DE 199 40 415 A 1

15 Int. Cl. 7:
A 23 L 1/30

21 Aktenzeichen: 199 40 415.1
22 Anmeldetag: 26. 8. 1999
24 Offenlegungstag: 8. 3. 2001

DE 199 40 415 A 1

71 Anmelder:
Spener, Friedrich, Prof. Dr., 48149 Münster, DE

72 Erfinder:
Spener, Friedrich, Prof. Dr., 48147 Münster, DE;
Wolfrum, Christian, Dipl.-Chem., 48149 Münster, DE

55 Entgegenhaltungen:
WO 99 20 722
Chem. Abstr. 130, 265265z (1999);
Chem. Abstr. 128, 304760m (1998);
Römpf, Lexikon chemie, 10. Aufl., 1999, Georg
Thieme Verlag, Stuttgart, Bd.4, S.3332;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

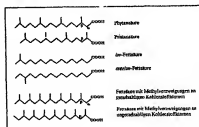
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

56 Verzweigtkettige Fettsäuren als fettabbauende Wirkstoffe

57 Die vorliegende Erfindung betrifft verzweigtkettige Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptoren (PPAR) Isoformen oder strukturverwandter, ligandaktivierter Kernrezeptoren und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken, als Wirkstoffe mit einem fettdepotreduzierenden Effekt. Zu diesen verzweigtkettigen Fettsäuren gehören die als Beispiele aufgeführten verzweigtkettigen Fettsäuren vom Isoprenoid- und Acetogenintyp. Weiterhin betrifft diese Erfindung den Einsatz dieser verzweigtkettigen Fettsäuren als Zusatzstoffe zu Diätetika, Nahrungsmitteln und Genußmitteln zur Vermeidung von Übergewicht und zur Reduktion bestehender Fettdepots.

26-08-99 199 40 415.1
375 19940415 00070

2 Die vorliegende Erfindung betrifft verzweigtkettige Fettsäuren, die mit einem der Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPAR) Isoformen oder strukturverwandter, ligandaktivierter Kernrezeptoren und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken, als Wirkstoffe mit einem fettdepotreduzierenden Effekt. Zu diesen verzweigtkettigen Fettsäuren gehören die als Beispiele aufgeführten verzweigtkettigen Fettsäuren vom Isoprenoid- und Acetogenintyp. Weiterhin betrifft diese Erfindung den Einsatz dieser verzweigtkettigen Fettsäuren als Zusatzstoffe zu Diätetika, Nahrungsmitteln und Genußmitteln zur Vermeidung von Übergewicht und zur Reduktion bestehender Fettdepots.



DE 199 40 415 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft natürliche Fettsäuren des Isoprenoid- und Acetogenintyps mit Methyl- und Ethylverzweigung und synthetische verzweigte Fettsäuren als Diäten- und Zusatzstoffe zu Nahrungs- und Genußmitteln zur Förderung des Fettabbaus bei Menschen.

Der Anspruch erstreckt sich auf natürliche und synthetische verzweigte Fettsäuren, deren Struktur angepaßt ist für die Bindung dieser Fettsäuren durch Isoformen des Peroxisomen Proliferator aktivierten Rezeptors (PPAR) sowie durch Lipidbindungsproteine vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine.

Die Lipidhomöostase in Menschen und in Säugetieren wird durch die Balance zwischen Energiezufuhr (Nahrungsaufnahme) und -verbrauch reguliert. Aus diesem Grund existieren Kontrollmechanismen in Bezug auf die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten und Fett, ihren Transport, Stoffwechsel, Einbau und Mobilisation. Übersteigt die Energiezufuhr den Energieverbrauch so wird dieses Gleichgewicht gestört und bedingt Gewichtszunahme, deren größter Anteil auf die Bildung von Fettpolys zurückzuführen ist (Woods et al. (1998) Science 280, 1378-1383).

Unter die Isoformen ligandaktivierter Kernrezeptoren des PPAR Typs fallen die bis heute bekannten PPAR α , PPAR β (auch Nucl oder FAAR) und PPAR γ -2 (Wahlí et al. (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 447, 199-209). Der katabole Fettstoffwechsel unterliegt der Kontrolle der PPARs, die als Zielmoleküle für hypolipidämische Medikamente fungieren und über die Steuerung mehrerer Schlüsselenzyme des peroxisomalen und mitochondrialen Stoffwechsels sowie der Lipoproteinlipase und verschiedener Apolipoproteine den katabolen Fettsäurestoffwechsel in Eukaryoten transkriptionell regulieren (Hashimoto et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 19228-19236). Die hypolipidämischen Medikamente werden unter dem Begriffe der peroxisomalen Proliferatoren zusammengefaßt; der Name dieser Stoffe leitet sich aus der Fähigkeit ab, ausschließlich in Nieren die peroxisomale Proliferation, d. h. Größe und Menge der Peroxisomen, zu induzieren. Bezogen auf den Menschen führt die Aktivierung dieser Rezeptoren zu einer gesteigerten Expression der lipiddabbauenden Enzyme, die sich zum Beispiel in einer Verringerung der Triacylglycerinkonzentration im Blut auswirkt und das Risiko einer Fettblutigkeit damit verbundenen Typ II Diabetes verringert. In jüngerer Zeit wurden geradkettige Fettsäuren als natürliche Agonisten der PPARs identifiziert (Bocos et al. (1995) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 53, 467-473).

Unter den Begriff Lipidbindungsproteine vom Strukturtyp der 14-15 kDa Fettsäurebindungsproteine (FABPs) fallen die bis heute bekannten 19 Mitglieder dieser Familie, die ein Strukturmotiv bestehend aus zwei orthogonalen β -Faltblättern sowie zwei α -Helices aufweisen (Hohoff und Spener (1998) Fet/Lipid 100, 252-263). Diese Proteine binden geradkettige Fettsäuren, manche Vertreter binden jedoch auch die hypolipidämischen Medikamente. Den erstmals 1972 beschriebenen Proteinen (Ockner et al. (1972) Science 177, 56-58) wird eine Rolle im intrazellulären Fettsäuretransport und Fettstoffwechsel einerseits und in der Regulation von Genen des Fettstoffwechsels andererseits zugeschrieben (Glatz et al. (1995) Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 52, 121-127). Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß die Lipidhomöostase durch die PPAR-vermittelte Genregulation durch Interaktion des Rezeptors und Lipidbindungsprotein sowie durch Interaktion beider Proteine mit geradkettigen Fettsäuren beeinflusst werden kann.

Erstmals konnten wir nun zeigen, daß die Lipidhomöostase auf die verzweigte Fettsäure Phytansäure äußerst empfind-

lich reagiert (Ellinghaus et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 2766- 2772). Dabei fungieren die Fettsäurebindungsproteine als cytosolische Diskriminator- und Transportproteine für die PPAR-Agonisten in den Kern, die dort über PPAR-Transaktivierung die Genexpression der Enzyme des katabolen Fettstoffwechsels steuern. Die Erfindung erstreckt sich auf verzweigte Fettsäuren, die über diesen Mechanismus die ligandaktivierten Kernrezeptoren besser transaktivieren als gesättigte und ungesättigte geradkettige Fettsäuren und daher einen verstärkten Abbau der Fettpolys bewirken. In pathologisch hohen Konzentrationen von Phytansäure in Sera und Lebern, wie in sterol carrier protein 2 defizienten Mäusen gezeigt, kommt es sogar zu einem Totalabbau der Fettpolys (Seedorf et al. (1998) Genes Dev. 12, 1189-1201). Bei Patienten mit bestimmten genetischen Stoffwechselerkrankungen, wie z. B. dem Refsum-Syndrom, kann der Spiegel der Phytansäure bei 1,3 mM liegen und langfristig neurologische Schäden bedingen (Kahlke et al. (1964) Klin. Wochenschr. 42, 1011-1018). Die verzweigten Fettsäuren sind jedoch als Minorbestandteile der menschlichen Nahrung, beispielsweise beträgt der Phytansäuregehalt im Serum Gesunder zwischen 0,5 und 10 μ M.

Zu den natürlich vorkommenden, verzweigten Fettsäuren gehören Isoprenoidfettsäuren, wie die Phytansäure und Pristanisäure, Acetogenin-abgeleitete Fettsäuren wie iso- und anteiso-Fettsäuren und die von der Uropolyglutridase der Vögel sezernierten Fettsäuren (Jacob und Ziswiler (1982) Avian Biology 6, 199-314), einschließlich der α - und β -Oxidationsprodukte aller verzweigten Fettsäuren soweit sie von den Kernrezeptoren und Lipidbindungsproteinen gebunden werden. Verzweigte Fettsäuren die von der Uropolyglutridase produziert werden, haben Methyl- und Ethylverzweigungen in variierender Anzahl an ungeradzähligen oder geradzähligen Kohlenstoffatomen der Fettsäurekette.

Beispiele für verzweigte Fettsäuren, die für die Erfindung relevant sind, sind in Abb. 1 dargestellt.

Der Anspruch bezieht sich auf den Einsatz der verzweigten Fettsäuren in reiner Form, als Mischung mehrere verzweigte Fettsäuren und als Proform. Zu letzteren zählen metabolische Vorstufen, die im Organismus zum Wirkstoff umgewandelt werden, zum Beispiel Phytol zu Phytansäure, und in Estern gebundene verzweigte Fettsäuren, aus denen der Wirkstoff im Organismus freigesetzt wird, zum Beispiel aus Triacylglycerinen.

Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1

Das Transaktivierungspotential der Fettsäuren und Medikamente für PPARs und damit für die Kapazität, fettabbauende Enzyme verstärkt zu induzieren, wird in Transaktivierungssays deutlich. Immortalisierte humane Leberzellen (HepG2) wurden mit einem PPAR α -sensitiven CAT-Reporter, einem Expressionsvektor für humanen PPAR α und einem β -Gal-Normierungsvektor transient transfiziert und mit den in Abb. 2 bezeichneten Agonisten für 24 h inkubiert. Die CAT- und β -Gal-Konzentration wurde jeweils durch ELISAs bestimmt, das Verhältnis beider Werte spiegelt die PPAR α -Transaktivierung wider. Das Ergebnis zeigt, daß die verzweigte Fettsäure Phytansäure und Pristanisäure den humanen PPAR α etwa 2-4 mal stärker als die geradkettigen Fettsäuren transaktivieren. Im Vergleich zum potenten hypolipidämischen Medikament Bezafibrat liegt die Aktivierungskapazität der Pristanisäure etwa doppelt so hoch (Abb. 2).

Beispiel 2

Wir zeigen in Abb. 3, daß neben PPAR das Fettsäurebindungsprotein ebenfalls ein Zielmolekül für PPAR-Agonisten ist, da die Transaktivierung von der intrazellulären Konzentration an Fettsäurebindungsprotein, das die Agonisten ebenso bindet, abhängt. HepG2-Zellen, die stabil mit antisense Leber (L-)FABP transfiziert wurden, haben je nach Klon einen geringeren L-FABP Gehalt als normale HepG2-Zellen. Diese Zellklone wurden wie unter Beispiel 1 beschrieben transfiziert, mit verzweig- und geradkettigen Fettsäuren für 24 h inkubiert und die CAT-, β -Gal- und L-FABP-Konzentration durch ELISAs bestimmt. Die beobachtete positive Korrelation von PPAR α -Aktivierung und intrazellulärer L-FABP-Konzentration beweist, daß L-FABP am Transport der Agonisten zum Kernrezeptor PPAR α beteiligt ist (Abb. 3), eine Extrapolation auf den Nullwert der L-FABP Konzentration ergibt, daß ohne L-FABP keine PPAR α -Aktivierung durch Agonisten möglich ist. Auch dieses Beispiel zeigt, daß verzweigkettige Fettsäuren das höhere Transaktivierungspotential als geradkettige Fettsäuren besitzen.

Beispiel 3

In vivo Untersuchungen an der Maus weisen die Bedeutung der verzweigkettigen Fettsäuren für die Genexpression und die Gewichtsabnahme nach. Mäusen wurden mit Normalfutter, dem 0,5 Gew.-% Pristanisäure zugesetzt wurde, für 2 Wochen ad libitum gefüttert und das Gewicht dieser Mäuse kontrolliert. Nach der Fütterung wurde die RNA aus der Leber isoliert und der Gehalt der mRNAs für die Enzyme des peroxisomalen katabolen Fettsäurestoffwechsels, der Acyl-CoA-Oxidase (ACO), des peroxisomalen bifunktionellen Enzyms (PBE) sowie der peroxisomalen Thiolase (pTHIOL) durch Northern-Blotting quantifiziert, normalisiert auf die stetige Expression der mRNA für Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). Es zeigt sich eine 2-4fache Anstieg in der mRNA-Konzentration der untersuchten Enzyme (Abb. 4) in der Leber der mit Pristanisäure-Zusatz gefütterten Mäuse. Zusätzlich zu dem Effekt auf die Enzyme war nach Fütterung dieser Fettsäure bei den Mäusen ein Gewichtsverlust von 2%, einhergehend mit einer teilweisen Reduktion des Fettgewebes zu beobachten. Dieser Versuch zeigt direkt am Organismus den Einfluß der verzweigkettigen Fettsäuren auf den katabolen Lipidstoffwechsel.

Patentansprüche

1. Natürliche isoprenoid- und acetogeninabgeleitete Fettsäuren mit Methyl- oder Ethylverzweigung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der PPAR Isoformen und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14–15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken.
2. Synthetische Fettsäuren mit Verzweigungsmustern, die natürlich nicht vorkommen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der PPAR Isoformen und/oder mit einem Lipidbindungsprotein vom Strukturtyp der 14–15 kDa Fettsäurebindungsproteine, direkt wechselwirken.
3. Verzweigkettige Fettsäuren gemäß Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Expression lipidabbauender Enzyme und die von Lipidbindungs- und -transportproteinen verstärken.
4. Proformen der verzweigkettigen Fettsäuren gemäß Ansprüche 1 und 2, wie die metabolischen Vorstufen

der verzweigkettigen Fettsäuren und wie die estergebundenen verzweigkettigen Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach Umwandlung in die Wirkstoffe die Expression lipidabbauender Enzyme und die von Lipidbindungs- und -transportproteinen verstärken.

5. Verwendung der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Diätikum zur Reduktion der Fettedepots.

6. Verwendung der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Diätikum zur Vermeidung von Übergewicht.

7. Applikation der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 5 und 6 als Einzelkomponenten oder im Gemisch geklist in Trägerölen oder in stabilen Emulsionen.

8. Applikation der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 5 und 6 als Einzelkomponenten oder im Gemisch in Kapseln, Dragees, Tabletten oder Pellets, oder als Zusatz zu festen oder flüssigen diätetischen Lebensmitteln.

9. Verwendung der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Zusatzstoffe zur Reduktion der Fettedepots.

10. Verwendung der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 1 bis 4 als Zusatzstoffe zur Vermeidung von Übergewicht.

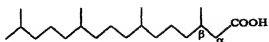
11. Applikation der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in Fetten, Ölen oder Fettmulsionen, wie beispielsweise Margarinen, für die menschliche Ernährung.

12. Applikation der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in übrigen Lebensmitteln und Materialien zur Herstellung von Lebensmitteln.

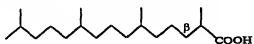
13. Applikation der verzweigkettigen Fettsäuren und ihrer Proformen gemäß Ansprüche 9 und 10 als Einzelkomponenten oder im Gemisch als Zusatzstoffe in Genussmitteln und in Materialien zur Herstellung von Genussmitteln.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

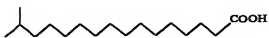
- Leerseite -



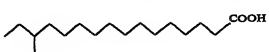
Phytansäure



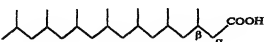
Pristansäure



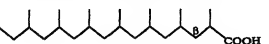
iso-Fettsäure



anteiso-Fettsäure



Fettsäure mit Methylverzweigungen an geradzahligen Kohlenstoffatomen



Fettsäure mit Methylverzweigungen an ungeradzahligen Kohlenstoffatomen

Abb. 1 Beispiele für verzweigt-kettige Fettsäuren

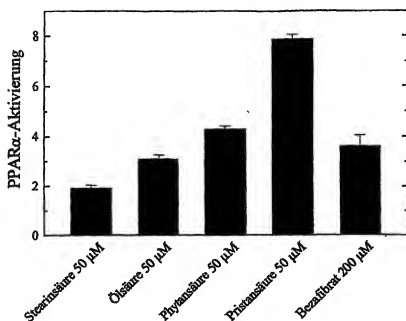


Abb. 2 Transaktivierung von humanem PPAR α in HepG2 Zellen durch Fettsäuren und Bezafibrat ($n=6 \pm \text{SD}$).

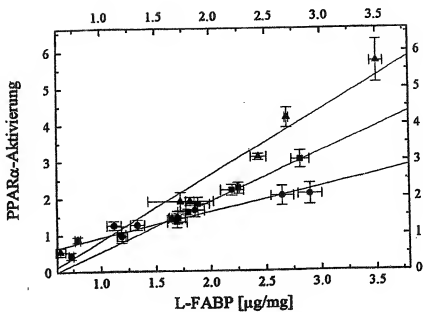


Abb. 3 Transaktivierung von humanem PPAR α in Abhängigkeit von L-FABP durch 200 μ M Stearinsäure (●), 50 μ M Arachidonsäure (■) und 100 μ M Phytansäure (▲) ($n=6 \pm$ SD)

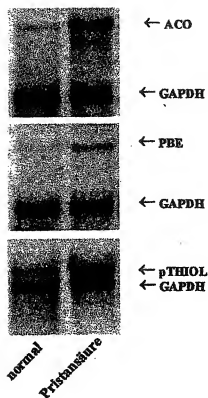


Abb. 4 Transaktivierung von Enzymen des peroxisomalen Fettsäurestoffwechsels in
Pristansäure gefütterten Mäusen ($n=3 \pm SD$)